

CERTIFICATE

(Translation)

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA.

FILING DATE:	May 15, 2003
APPLICATION NUMBER:	03 1 36113.7
APPLICATION CATEGORY:	Invention
ENTITLED:	Oligonucleotides antagonist for Human tumor necrosis factor α (TNF α)
APPLICANTS:	Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention
INVENTORS:	Zhiqing Zhang Xinrui Yan Ketai Guo Chunxiao Xu

THE STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC
OF CHINA

DIRECTOR GENERAL: Jingchuan, WANG

ISSUE DATE: January 5, 2004

Zhiqing ZHANG et al.
April 13, 2004
BSKB
(703) 205-8000
4533-0108 PUS 1
1 of 2

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2003 05 15

申 请 号： 03 1 36113.7

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 抑制人肿瘤坏死因子活性的寡聚核苷酸

申 请 人： 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

发明人或设计人： 张智清； 严馨蕊； 郭克泰； 徐春晓

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2004 年 1 月 5 日

权 利 要 求 书

1. 一种能与人肿瘤坏死因子 (TNF) 特异结合的寡聚核苷酸序列,
选自:

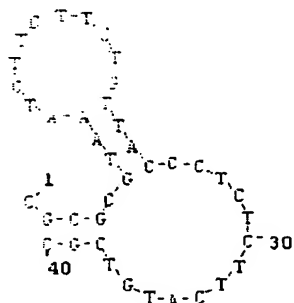
- 5 a) SEQ NO: 1 所示的寡聚核苷酸;
- b) SEQ NO: 2 所示的寡聚核苷酸;
- c) SEQ NO: 3 所示的寡聚核苷酸;
- d) SEQ NO: 4 所示的寡聚核苷酸;
- e) SEQ NO: 5 所示的寡聚核苷酸;
- 10 f) SEQ NO: 6 所示的寡聚核苷酸;
- g) SEQ NO: 7 所示的寡聚核苷酸;
- h) SEQ NO: 8 所示的寡聚核苷酸;
- i) SEQ NO: 9 所示的寡聚核苷酸;
- j) SEQ NO: 10 所示的寡聚核苷酸;
- 15 k) SEQ NO: 11 所示的寡聚核苷酸;
- l) SEQ NO: 12 所示的寡聚核苷酸;
- m) SEQ NO: 13 所示的寡聚核苷酸;
- n) SEQ NO: 14 所示的寡聚核苷酸;
- o) SEQ NO: 15 所示的寡聚核苷酸;
- 20 p) SEQ NO: 16 所示的寡聚核苷酸;
- q) SEQ NO: 17 所示的寡聚核苷酸;
- r) SEQ NO: 18 所示的寡聚核苷酸;
- s) SEQ NO: 19 所示的寡聚核苷酸;
- t) SEQ NO: 20 所示的寡聚核苷酸;
- 25 u) SEQ NO: 21 所示的寡聚核苷酸;
- v) SEQ NO: 22 所示的寡聚核苷酸;
- w) SEQ NO: 23 所示的寡聚核苷酸;
- x) SEQ NO: 24 所示的寡聚核苷酸;
- y) SEQ NO: 25 所示的寡聚核苷酸;
- 30 z) SEQ NO: 26 所示的寡聚核苷酸;
- aa) SEQ NO: 27 所示的寡聚核苷酸;

bb) SEQ NO: 28 所示的寡聚核苷酸。

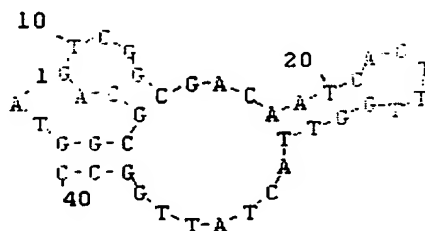
2. 根据权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列, 包括 DNA 序列 RNA 序列, 其特征在于所述的 DNA SEQ NO: 1-18 的序列具有以下两种二级结构之一:

5

10



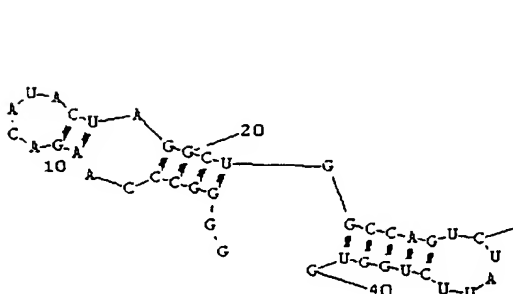
I



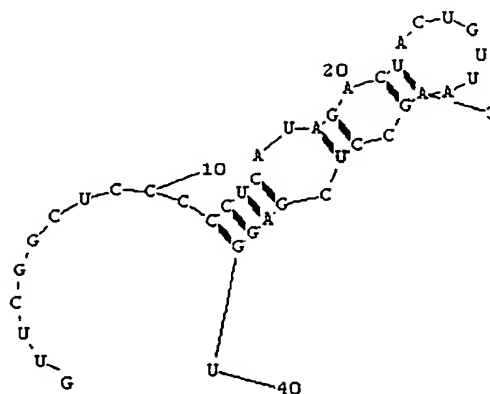
II

3. 根据权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列, 其特征在于所述的 RNA

15 SEQ NO: 19-28 的序列具有以下两种二级结构之一:



III



IV

4. 如权利要求 1 所述的寡聚核苷酸的反义核苷酸序列。

5. 一种在严紧条件下与权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

20

6. 一种具有与权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列至少 60%同源并且具有相同功能的寡聚核苷酸序列。

7. 如权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列的衍生序列。
8. 如权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列修饰后的序列。
9. 一种具有与权利要求 1 所述的寡聚核苷酸序列至少 80%同源并且具有相同功能的寡聚核苷酸序列。
- 5 10. 如权利要求 1、5、6 或 10 任意一项所述的寡聚核苷酸序列在制备用于诊断或治疗与 TNF- α 相关的疾病的药物中的用途。

抑制人肿瘤坏死因子活性的寡聚核苷酸

5 技术领域

本发明涉及一组新的寡聚核苷酸序列。具体而言，本发明涉及一组新的抑制人肿瘤坏死因子活性的寡聚核苷酸。目的寡聚核苷酸是利用 SELEX 技术，从随机的寡聚核苷酸库筛选到的与 TNF α 特异结合的适配子 (Aptamer)。本发明还涉及所述寡聚核苷酸序列的衍生序列，
10 包括修饰后的序列。本发明进一步涉及所述的寡聚核苷酸序列在制备用于诊断或治疗与 TNF- α 相关的疾病的药物中的用途。

背景技术

人肿瘤坏死因子 α (hTNF α) 是巨噬细胞/单核细胞活化产生的一种多功能细胞因子，具有广泛的生物学活性，在炎症反应、免疫调节、
15 抗肿瘤、抗微生物与寄生虫感染方面起重要作用，在人细胞因子免疫调节网络中起中枢调节作用。在患炎症、自身免疫病、变态反应、休克等疾病时，TNF- α 的表达量成百上千倍的增加，促进炎症过程，使病情加重。由于 TNF- α 是一种重要的致病因子，与许多自身免疫疾病
20 如：成人类风湿性关节炎 (RA)、儿童多发性风湿性关节炎 (TRA)、脓毒血症、心肌细胞死亡、系统性红斑狼疮 (SLE) 及糖尿病等密切相关，所以拮抗 TNF- α 是治疗这些疾病的重要措施之一 (Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system Immunology, 1998,10:423~434)。

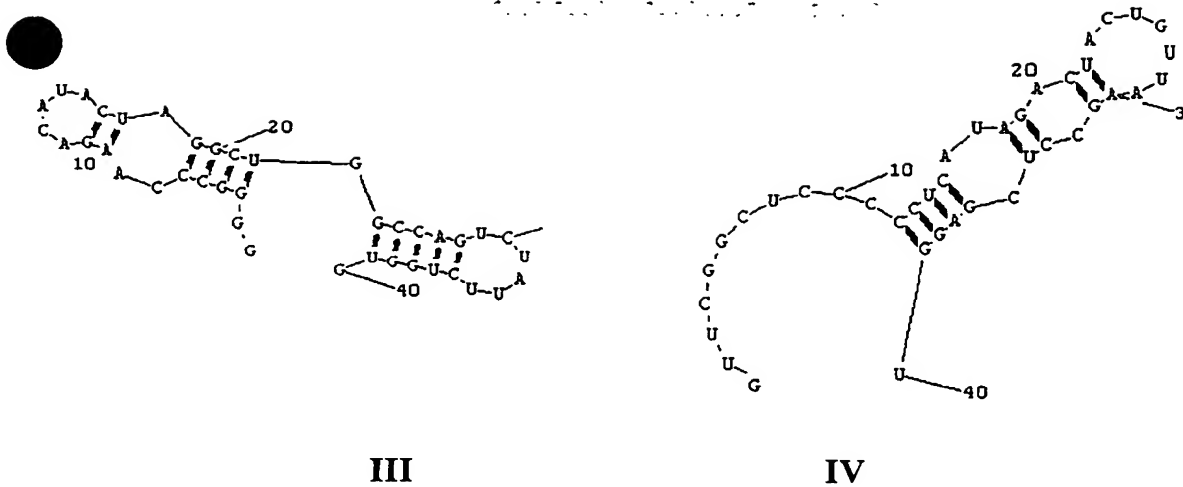
25 已经有多种用于治疗这些疾病的 TNF 抑制剂。(Treatment of rheumatoid arthritis: new therapeutic approaches with biological agents. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2001 May;1(1):45-65) 例如：美国 Johnson & Johnson 公司推出的治疗类风湿性关节炎、局限性肠炎的新药 Infliximide (Avakine; ReMicade)，已于 1998 年 11 月上市。
30 Infliximide 为以 TNF 为靶蛋白的嵌合抗体。美国 Immunex 公司推出的治疗类风湿性关节炎、局限性肠炎的新药 Etemercept (Embrel; Enbrel)，

已于 1998 年 12 月上市。Etenerecept 为 IgG1 Fc 区与肿瘤坏死因子(TNF)受体 p75 的融合蛋白。(Etenerecept in rheumatoid arthritis. Expert opin Pharmacother.2001,2(7):1137~1148) (Psoriatic arthritis: the role of TNF inhibition and the effect of its inhibition with etanercept. Clin Exp Rheumatol. 2002 Nov-Dec;20(6 Suppl 28):S116-21.) 虽然蛋白质药物的使用取得了较好的疗效,但是也存在许多缺点。蛋白质的生产工艺复杂,成本昂贵;蛋白质药物分子量大,因而组织渗透性差,很难到达靶组织;由于血浆清除率很低,难以排泄,造成其在体内聚积,引起不良反应;由于外源蛋白的引入及结构的变化,使其具有免疫原性,反复使用后会诱生抗体。小肽具有优良的药代动力学性质,组织渗透性增强,然而,由于缺乏可用的靶分子,亲和力低等缺点使其在临床应用时又受到了限制。(What are the risks of biologic therapy in rheumatoid arthritis? An update on safety. J Rheumatol Suppl. 2002 Sep;65:33-8.)

发明内容

为了克服现有技术的不足之处,本发明提供一组能与 TNF 特异结合的寡聚核苷酸序列,包括 DNA 序列(NO: 1-18) RNA 序列(NO: 19-28),它们选自:

- a) SEQ NO: 1 所示的寡聚核苷酸;
- b) SEQ NO: 2 所示的寡聚核苷酸;
- c) SEQ NO: 3 所示的寡聚核苷酸;
- d) SEQ NO: 4 所示的寡聚核苷酸;
- e) SEQ NO: 5 所示的寡聚核苷酸;
- f) SEQ NO: 6 所示的寡聚核苷酸;
- g) SEQ NO: 7 所示的寡聚核苷酸;
- h) SEQ NO: 8 所示的寡聚核苷酸;
- i) SEQ NO: 9 所示的寡聚核苷酸;
- j) SEQ NO: 10 所示的寡聚核苷酸;
- k) SEQ NO: 11 所示的寡聚核苷酸;
- l) SEQ NO: 12 所示的寡聚核苷酸;



5

10 本发明还涉及所述的寡聚核苷酸的反义核苷酸序列。

本发明进一步涉及在严紧条件下与所述的寡聚核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

本发明还涉及一种具有与所述的寡聚核苷酸序列至少 60%同源并且具有相同功能的寡聚核苷酸序列。

15 本发明还涉及所述的寡聚核苷酸序列的衍生序列。

本发明还涉及所述的寡聚核苷酸序列修饰后的序列。

本发明还涉及所述的寡聚核苷酸序列在制备用于诊断或治疗与 TNF- α 相关的疾病的药物中的用途。

20 本发明还涉及一种具有与所述的寡聚核苷酸序列至少 80%同源并且具有相同功能的寡聚核苷酸序列。

25 本发明所述的寡聚核苷酸序列即适配子，是采用 SELEX 过程筛选出的寡聚核苷酸，它可以是单链 RNA、单链 DNA、双链 DNA。适配子能与靶分子特异性结合，抑制其生物学作用。与蛋白质相比，适配子的优点在于，高特异性、高亲和力；很快到达靶组织；快速的血浆清除率；从肾脏排泄；免疫原性低，可以反复使用；在靶组织中保持高浓度。寡聚核苷酸可以通过体外合成获得，易于生产和纯化，未混入其它蛋白和抗原，不易引起人体的免疫反应。它还具有如下优点：可以进行广泛的位点特异性修饰，这就使它可进行特殊目的的研究与应用。在研究工作中，它可以被荧光染料、放射性同位素、生物素标记。

30 在临床应用中，它可以与放射性核苷酸、细胞毒素和其他毒物相连。

所有的蛋白表位都适合作为适配子的靶位点, SELEX 筛选出的寡聚核苷酸作为拮抗剂时, 解离常数为 50pM-10nM, 靶分子与受体结合的 K_{is} 与之基本相同。所以, 寡聚核苷酸可以与受体竞争结合靶分子。

适配子与靶分子的亲和力很高, 它高于 ScFv 和噬菌体呈现的短肽。
5 而且, 适配子的大小为 8-15KD, 它的分子量在小肽(1KD)和 ScFv(25KD)之间, 二聚适配子的分子量大小与 ScFv 相近。

所述的寡聚核苷酸序列即适配子能有效抑制 TNF α 对 L929 细胞的杀伤作用, 这说明适配子能有效抑制 TNF α 与其受体的结合。因此, 本发明适配子可以用来治疗由于 TNF α 水平升高而引起的疾病。它既有
10 单克隆抗体的亲和力和特异性, 又具有小分子多肽的渗透性和药代动力学性质。

附图说明

图 1 为 SELEX 结果的 PCR 电泳结果。从图中可以看出 PCR 产物
15 为 71bp 左右。

图 2 显示 ELISA 法检测适配子与 TNF 的亲和力。纵坐标为 OD450 的值, 横坐标 1—18 为筛选到的 18 个适配子, 19 为空白对照(未包被 TNF), 20 为阴性对照 1(未加核酸), 21 为阴性对照 2(原始寡聚核苷酸库)。

20 图 3 显示 Dot-ELISA 法检测适配子对 TNF 的亲和性。ssDNA 量在 4 μ g 后, 显色信号强度不再增强, 当 ssDNA 量少于 10^{-6} μ g 时, 无显色信号出现。

图 4 为不同生长状态下的 L929 细胞。(1) 为正常状态的 L929 细胞; (2) 为 50% 被 TNF 杀死的细胞 (3) 为加入核酸-TNF 混合物的
25 细胞; (4) 为 100% 被 TNF 杀死的细胞。

图 5 为 ELISA 法检测 1—12 轮筛选出的 RNA 适配子与 TNF 的亲和力的变化。

图 6 显示 Dot blot 检测 RNA 适配子对 TNF 的亲和性, RNA 与 TNF 结合, 其中 1-10 为所筛选的 10 个 RNA 序列; 11 为 RNA 库; 12 为阴
30 性对照(未加 TNF α)。

图 7 为 RNA 与 TNF 结合的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定结果, 其中, 1

为 marker, 2-11 为 RNA 与 TNF, 12 为原始 RNA 库与 TNF, 13 为 TNF。

图 8 为 ELISA 法检测目的 RNA 与 TNF α 的结合力的结果, 其中, 1-10 为 10 个 RNA 序列; 11 为 RNA 库。

图 9 显示了 MTT 法检测不同稀释度的寡聚核苷酸样品对 TNF α 杀伤 L929 细胞的保护作用, 其中 1-10 为 RNA 样品, 11 为未被寡聚核苷酸保护的 TNF 破坏的阳性对照细胞, 12 为正常对照细胞。

图 10 为 RNase 降解 RNA 反应的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定结果, 其中 1. marker, 2. 未经消化的 RNA, 3-7. 分别为反应后第 1、2、4、8、16 小时后的 RNA。

具体实施方式

下面以实施例的方式对本发明进行进一步阐述, 但仅仅是为了阐明本发明, 而非限制本发明。本领域技术人员将会理解, 在不背离本发明发明点的情况下, 可以作多种修改与变化, 这些修改与变化也将包括在本发明的范围之内。

本发明人用 SELEX 方法筛选到寡聚核苷酸适配子。本文中术语“SELEX”是指“指数富集式配基系统进化”(system evolution of ligands by exponential enrichment)的英文缩写。由于单链寡聚核苷酸无论在分子结构和功能上都具有多样性, 因此构建单链寡聚核苷酸的随机序列组合库, 使其与结合在膜上的靶蛋白分子结合, 洗去非特异性结合的寡聚核苷酸, 然后在变性的条件下洗脱特异性结合的寡聚核苷酸, 经 PCR 扩增用于下一轮筛选。初步筛到的寡聚核苷酸分子经过多轮的扩增和筛选, 便可筛选到与靶蛋白具有高亲和性的寡聚核苷酸分子, 即适配子(Aptamer)。1990年, Tuerk 和 Gold 用 SELEX 方法筛选出 T4 RNA 聚合酶的适配子, (system evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase, Tuerk C., Gold L. Science. Vol 249 505-510, 1990) 随后 Ellington 和 Szostak 对适配子用于科研和工业生产产生了兴趣, 适配子很快成为极有价值的研究工具, 并且在基础研究, 药物筛选及临床诊断和治疗方面显示出广泛的应用前景。(In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature. 1990 Aug 30; 346(6287): 818-22.) 目前, 国外已有多种适

配子药物进入临床试验阶段，例如：用于治疗凝血和血栓形成、治疗
 内膜增生和抑制血管生成等药物。（Nuclease-resistant nucleic acid
 ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor.
 Chem Biol. 1995 Oct;2(10):683-95.)(Oligonucleotide inhibitors of human
 5 thrombin that bind distinct epitopes. J Mol Biol. 1997 Oct
 10;272(5):688-98.) Inhibition of receptor binding and VEGF-induced
 vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded
 domain. J Biol Chem. 1998 Aug 7;273(32):20556-67)

本发明中用于 SELEX 的单链 DNA 随机库及引物由大连 Takara 公
 10 司合成，两端为固定序列，中间为 40 个碱基的随机序列：5'-ggg agg acg
 atg tta (N40) aag aag act cgc aag a-3'，库容量为 10^{15} - 10^{16} ，引物 1：
 5' -ggg agg acg atg tta-3'，引物 2：5' -tct tgc gag tct tct t-3'，引物 3：
 5' -taa tac gac tca cta ta-3'，引物 4：5' -taa tac gac tca cta ta ggg agg acg
 atg tta-3'。TNF α 为本实验室制备，T7 体外转录试剂盒购于 Promega
 15 公司，MLV 逆转录酶购于 Biolab 公司，硝酸醋酸混合纤维素滤膜 HATF
 购于 Millipore 公司，寡聚核苷酸的纯化试剂购于 Qiagen 公司，T 载体
 购于大连 Takara 公司，其它常规试剂购于各大试剂公司。以下是筛选
 和鉴定寡聚核苷酸的技术路线。

ssDNA 随机寡聚核苷酸库的合成 \longrightarrow 利用 SELEX 方法对寡聚核苷酸
 20 库进行筛选 \longrightarrow 扩增与 TNF 特异结合的寡聚核苷酸 \longrightarrow 进行下一
 轮筛选 \longrightarrow 12-15 轮筛选后获得目的寡聚核苷酸序列 \longrightarrow 克隆
 测序 \longrightarrow 与 TNF α 的结合活性检测 \longrightarrow 生物学活性检测。

下文中实施例 1-4 为 DNA 适配子的筛选、鉴定和生物学活性的检
 测。

25 实施例 5-15 为 RNA 适配子的筛选、鉴定和生物学活性的检测。

实施例 1：体外筛选与 TNF 特异结合的适配子

扩增 DNA 库

利用引物 1，引物 2 扩增单链 DNA 库，然后取 1 μ l 做不对称 PCR，
 产物回收后加结合缓冲液（Binding buffer）（ $2 \times$ 1MNaCl，
 30 40mMTrisCl，2mMMgCl₂）200 μ l，95 $^{\circ}$ C 变性 5min，冰浴 5min；加
 入 1 μ lTNF（1ug/ μ l），37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后通过滤膜，先用 PBS 冲洗，然

后用 300ul 洗脱缓冲液浸泡 (10mM EDTA, 7M 尿素的结合缓冲液), 乙醇沉淀回收 DNA, 取上述溶解物 10 μ l 作模板, 进行下一轮筛选。在最后几轮筛选中, 用少量 TNF, 以便得到预期具有高亲和力的寡聚核苷酸, 共进行 12 轮筛选。

5 克隆和测序

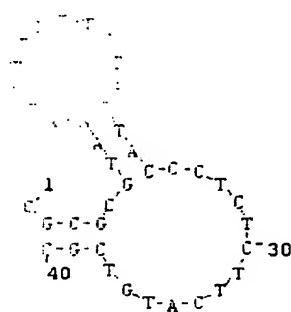
筛选 12 轮后, 将最后的筛选产物连接到 pGEM T-载体(Promega)上, 经 PCR 鉴定后测序, 得到 18 个适配子 (即目的寡聚核苷酸序列)。PCR 结果见图 1。这 18 个适配子核酸序列见 SEQ ID NO: 1-18。

10 实施例 2: 目的适配子的二级结构分析

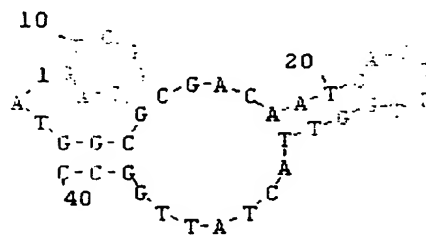
用 DNASYS v2.5 软件分别分析 18 个适配子序列的最低二级结构能量, 模拟其二级结构, 发现至少可能存在 2 种具有特征性的二级结构形状。其一如下式 I 为代表, 主要特征为双茎环结构; 其二如下式 II 为代表, 主要特征为三茎环结构。

15

20



I



II

25

实施例 3: DNA 适配子与 TNF 亲和力的测定

合成生物素标记的 DNA 适配子, 用两种方法测定目的适配子与 TNF 的亲和力。

1. 常规 ELISA: 用 1 μ g/ml TNF 包被 96 孔酶标板; 1% BSA 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时; 将 5' 标记生物素的 DNA 适配子倍比稀释后加入各孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时; 加入 1:400 稀释的辣根过氧化物酶标记的链亲和素 100

μl, 37℃温育 1 小时; 加入显色液避光显色, 在酶标仪上读取 OD450 值。结果见附图 2。

2. Dot-ELISA 法: 将不同浓度的 5' 标记生物素的核酸与 TNF 混合, 37℃水浴 1h。将 NC 膜固定在滤器中, 加入 TNF 和标记核酸的混合物过滤。洗去未结合的核酸, 加辣根过氧化物酶标记的链亲和素于膜上, 37℃温育 30min。然后 DAB 显色。阳性对照是标记的核酸, 阴性对照是牛血清蛋白。结果见附图 3。其中, ssDNA 量在 4ug 后, 显色信号强度不再增强, 当 ssDNA 量少于 10^{-6} ug 时, 无显色信号出现。

以上结果显示我们筛选到的适配子与 TNF 的结合是特异性的, 并具有高亲和力。

实施例 4: 适配子拮抗 TNF 活性的检测

96 孔培养板培养好的小鼠 L929 细胞, 每孔加入含 1ug/ml 的丝裂霉素和 TNF 与不同浓度寡核苷酸的混合物, 阳性对照含 TNF 和 1ug/ml 丝裂霉素, 阴性对照 1 含 1ug/ml 丝裂霉素, 阴性对照 2 只加核酸和 1ug/ml 丝裂霉素。24h 后观察细胞的杀伤情况。用 MTT 法测定细胞的存活率。

结果见附图 4, 其中 A 为正常状态的 L929 细胞; B 为 50% 被 TNF 杀死的细胞; C 为加入核酸-TNF 混合物的细胞; D 为 100% 被 TNF 杀死的细胞。结果表明, 我们筛选得到的核酸适配子对 TNF 具有中和活性, 能抑制 TNF 对 L929 细胞的杀伤作用。

以下为利用 SELEX 技术筛选与 TNF 特异结合的 RNA 寡聚核苷酸的实施例。

实施例 5: 单链 DNA 库扩增获得含 T7 启动子的双链 DNA 库

利用引物 2: 5' -tct tgc gag tct tct t-3', 引物 3: 5' -taa tacgac tca cta ta-3' 和引物 4: 5' -taa tac gac tca cta ta ggg agg acg atg tta-3', 扩增单链 DNA 库, 扩增产物用 Qiagen 公司的核算纯化试剂盒进行纯化。

实施例 6: 体外转录获得单链 RNA 库

将 1nmol DNA 模板与缓冲液、T7RNA 多聚酶和 RNA 酶抑制剂混合后, 37℃孵育 1 小时, 加入 RQ1 DNA 酶 1 μl, 37℃孵育 15 分钟。转录产物用

Qiagen公司的核酸纯化试剂盒纯化。然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，结果证明我们获得71个碱基的体外转录产物。

实施例 7：从单链 RNA 库获得与 TNF 结合的目的寡聚核苷酸

1nmol ssRNA, 95°C变性 5min, 冰水浴 5min, 加入结合缓冲液
5 (含 1mM MgCl₂, 10mM DTT 的 PBS 溶液)180 μl, 加入 200pmol TNF, 37°C 孵育 30min 后通过滤膜, PBS 冲洗后, 取出膜放入离心管, 用 300 μl 洗脱缓冲液浸泡 (含 10mM EDTA, 7M 尿素的结合缓冲液), 乙醇沉淀回收 RNA, 产物 RNA 经 RT-PCR 获得双链 DNA, 经纯化后进行体外转录, 其产物用于下一轮筛选。在最后几轮筛选中, 用少量 TNF,
10 进而得到与 TNF 具有高亲和力的寡聚核苷酸, 共进行 12 轮筛选。

实施例 8：用 ELISA 法测定每一轮筛选到的 RNA 适配子与 TNF 的亲合力

将每一轮 RT-PCR 的产物进行体外转录, 掺入生物素标记的 UTP (标记的 UTP 与未标记 UTP 1/2 混合) 进行标记。用 50 μl TNF (1 μg/ml) 包被酶标板, 4°C 过夜, 100 μl 1%BSA 封闭, 37°C 孵育 1 小时, 加入 50 μl
15 生物素标记的 RNA, 37°C 孵育 1 小时, 加入辣根过氧化物酶标记的亲合素 50 μl, 37°C 孵育 1 小时, 加入底物显色。用酶标仪测定显色结果。见附图 5, 随着筛选轮数的增加, 适配子与 TNF α 的结合活性增加, 第 12 轮筛选后, 结合活性不再增加。

实施例 9：获得目的寡聚核苷酸序列

20 经过 12 轮筛选后, 经 RT-PCR 获得双链 DNA, 将片段连接到 T 载体。

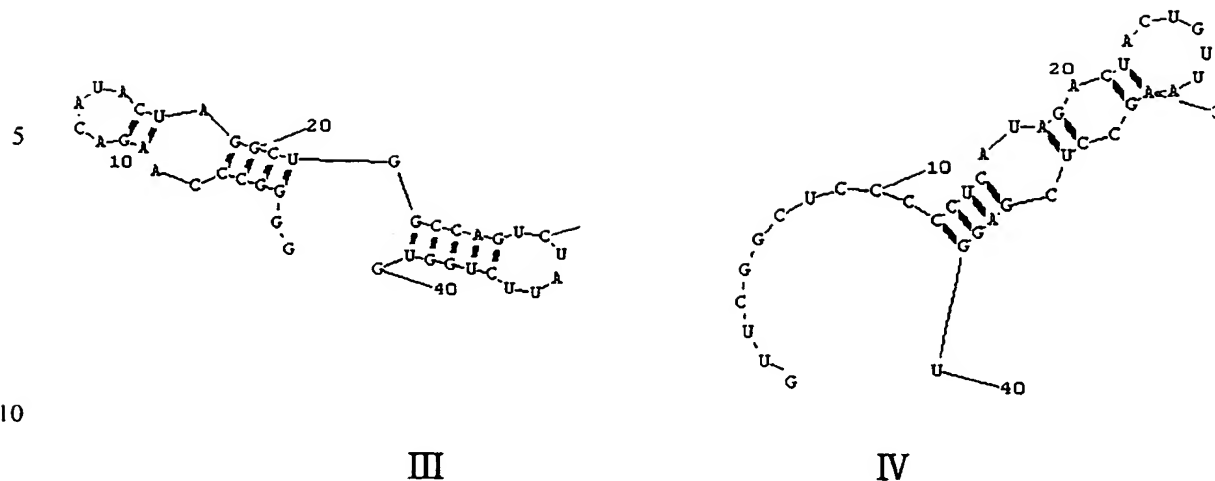
取 5 μl 连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌, 挑取白色菌落, 提取质粒, PCR 鉴定阳性克隆, 以其为模板扩增双链 DNA, 以此 DNA 为模板, 进行体外转录获得 ssRNA, 用打点杂交法定性测定其与 TNF α 的结合活性。

25 对阳性克隆进行测序。测序结果见 SEQ ID NO: 19-28, 共得到 10 个对 TNF α 具有高亲和力的序列。

实施例 10 对测序结果进行分析

用 RNA structure 软件分析 RNA 的二级结构, 获得以下两种代表

性的二级结构。



其一以结构III为代表，主要特征为5'端或3'端为单茎环或双茎环结构；其二以结构IV为代表，主要特征为三茎环结构。

实施例 11：用斑点杂交法测定寡聚核苷酸与 TNF α 的亲合力

经过 12 轮筛选后获得的寡聚核苷酸序列，合成其对应的寡聚脱氧核苷酸作模板，体外转录获得寡聚 RNA，取 10ng 生物素标记的 RNA 与 100ng TNF α 加入结合缓冲液 20 μ l，37 $^{\circ}$ C，30min(水浴)，点于筛选用膜，2%BSA 封闭，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，加入辣根过氧化物酶标记的亲和素 (1: 400) 10ml，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，加入二氨基联苯胺显色。结果显示，10 个 RNA 序列与 TNF α 有不同程度的结合，RNA 库与 TNF α 无结合，RNA 对膜无吸附。

实施例 12：利用凝胶滞后试验研究目的寡聚核苷酸与 TNF 的结合特性。

如实施例 11 中体外转录获得 40 个碱基的寡聚 RNA，95 $^{\circ}$ C 变性 5min，迅速冰水浴 5min，加入结合缓冲液 10 μ l，加入 0.2 μ l TNF，37 $^{\circ}$ C，30min(水浴)，5%聚丙烯酰胺凝胶电泳，取出后进行银染，观察结果。见附图 7。从电泳结果可以看出，RNA 1-10 与 TNF 结合后发生凝胶滞后现象。RNA 库与 TNF α 无结合，未发生凝胶滞后现象。

实施例 13: 用 ELISA 法检测目的 RNA 与 TNF α 的结合活性

将体外转录获得寡聚核苷酸, 进行梯度稀释, 用 ELISA 法检测其与 TNF α 的结合活性, 见附图 8。10 个 RNA 序列与 TNF α 有不同程度的结合, 其中 5、6、7、8、10 与 TNF α 的结合力较强, 当稀释度为 2×10^4 时 (约为 1pg) 仍为阳性结果, RNA 库与 TNF α 无结合。

实施例 14: 适配子的抑制 TNF 对 L929 细胞的杀伤作用

体外转录获得的 RNA100ng 用含 10%FBS、 $1 \mu\text{g/ml}$ 丝裂霉素和的 RPMI1640 培养基 3 倍稀释, 后加入 hTNF α , 使其终浓度为 10unit。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2hr, 用鼠 L929 细胞检测 hTNF α 残留的体外生物学活性, 测活方法同上进行, MTT 显色, 570nm 测 OD 值。

附图 9 显示了不同稀释度的寡聚核苷酸样品对 TNF α 杀伤 L929 细胞的保护作用 8×10^3 倍稀释的样品仍具有保护作用。

实施例 15: 血清对 RNA 降解试验

取 250ngRNA 适配子 7, $50 \mu\text{l}$ 未灭活的新鲜人血清, 加 PBS 至总体积为 $100 \mu\text{l}$ 。混匀, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴。分别于反应后第 1、2、4、8、16 小时各取 $20 \mu\text{l}$ 样品, 酚:氯仿抽提后, 20%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 银染后观察结果。结果表明此 RNA 稳定性好, 则体内生物半衰期较长, 血清消化 4 小时的时候降解很少, 血清消化 8 小时仅有 10%降解, 血清消化 16 小时仅有 30%降解。

20 实施例 16: RNA 酶对 RNA 降解试验

取 250ngRNA 适配子 7, 加入 RNA 酶使其终浓度为 $20 \mu\text{g/ml}$, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴。分别于反应后第 1、2、4、8、16 小时各取 $20 \mu\text{l}$ 样品, 酚:氯仿抽提后, 20%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 银染后观察结果。结果见附图 10。结果表明此 RNA 不能耐受高浓度 RNA 酶的消化, 证实其确实为 RNA 分子。

序列表

<110> 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

5 <120> 抑制人肿瘤坏死因子活性的寡核苷酸

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

10

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

15

<400> 1

cgcgcgtaaa tcttcttctg ttaccctctc ttcattgcgc 40

<210> 2

20

<211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

25

cgctggagga cgatgttaat tagaccgcaa ctacattgca 40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

30

<213> 人

<400> 3

cgatctacgt ggtgactcat acgtgtcgat gtgcctttcc 40

35

<210> 4

<211> 40
<212> DNA
<213> 人

5 <400> 4
gcacactaag tttctacacg tctcgtcgcc ctctttgtgc 40

<210> 5
<211> 40
10 <212> DNA
<213> 人

<400> 5
atggcgcagt cggcgacaat cactttggtt actattggcc 40

15 <210> 6
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

20 <400> 6
cggtgtcccc gcactttgat cgtcgacctg ttgtattgcc 40

<210> 7
25 <211> 40
<212> DNA
<213> 人

<400> 7
30 ggcggggtct ctaaagtgtg ttatcatctg cttgttggcc 40

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
35 <213> 人

<400> 8
cactgtaatc agaggctttt ttactctcgc tgcattccgg 40

5 <210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

10 <400> 9
gcccagcgtc cgacactaac tagtcgccaa acaatcagcc 40

<210> 10
<211> 40
15 <212> DNA
<213> 人

<400> 10
tggcagatat actcacaac ctctcacagg aacctggggc 40

20 <210> 11
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

25 <400> 11
tgcacaccgg tgatttagcc tggcgtgctt caccttcacc 40

<210> 12
30 <211> 40
<212> DNA
<213> 人

<400> 12
35 ccacgtctac acttaccct gtgacagcta tactcatcac 40

<210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人

5

<400> 13
 ccccgccatg tgcttagtgc aataacgttc tcaccgcccc 40

10

<210> 14
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人

15

<400> 14
 cactgtttga cgtttcggat taaggagtcc gctcgcaccc 40

20

<210> 15
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人

25

<400> 15
 tcccatcaaa accaaatttc gggctctgctc tctctctgcc 40

30

<210> 16
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人

35

<400> 16
 tggggatgcg gtctgcctaa caacagggtc tcacttaccc 40

<210> 17
 <211> 40

<212> DNA

<213> 人

<400> 17

5 ccgacgtact cggtagacaa gtcccctgaa gtgtgacgcc 40

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

10 <213> 人

<400> 18

gcggccgata aggtctttcc aagcgaacga attgaaccgc 40

15 <210> 19

<211> 40

<212> RNA

<213> 人

20 <400> 19

ggggcccaag acauacuagg cuggccaguc uauucuggug 40

<210> 20

<211> 40

25 <212> RNA

<213> 人

<400> 20

aguaccacac acucaaucga gugcacggca aagcuuccgc 40

30

<210> 21

<211> 40

<212> RNA

<213> 人

35

<400> 21
gcacgaucua cgaugcucac cagaggagug caucuucucc 40

5
<210> 22
<211> 40
<212> RNA
<213> 人

10
<400> 22
gcaacaucau caccgaaccc guauugaguc aauuugugau 40

15
<210> 23
<211> 40
<212> RNA
<213> 人

<400> 23
gcguagcaaa cgcaccgcac aggcccgcgg cuaagcauuu 40

20
<210> 24
<211> 40
<212> RNA
<213> 人

25
<400> 24
uccugcauga accuuuucuc cgcgcucuuu ggaccuauaca 40

30
<210> 25
<211> 40
<212> RNA
<213> 人

35
<400> 25
guucggcucc ccuacauaga cuacuguuuaa gccucgaggu 40

<210>	26
<211>	40
<212>	RNA
<213>	人

5

<400> 26
gcauauaucg cuaauccaac aucgagucug gucauuacag 40

10

$\langle 210 \rangle$	27
$\langle 211 \rangle$	40
$\langle 212 \rangle$	RNA
$\langle 213 \rangle$	人

15

<400> 27
guacccgauc uggccguauu uugacgacau caacgugcgg 40

20

$\langle 210 \rangle$	28
$\langle 211 \rangle$	40
$\langle 212 \rangle$	RNA
$\langle 213 \rangle$	人

<400> 28
ccaggggugua uccaaccaga acaacauacc cgacaaacgu 40

25

说明书附图

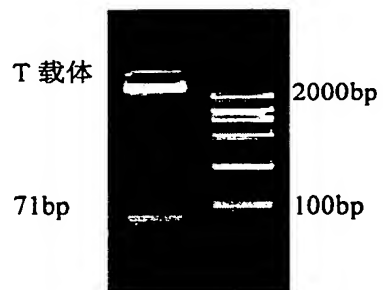


图 1

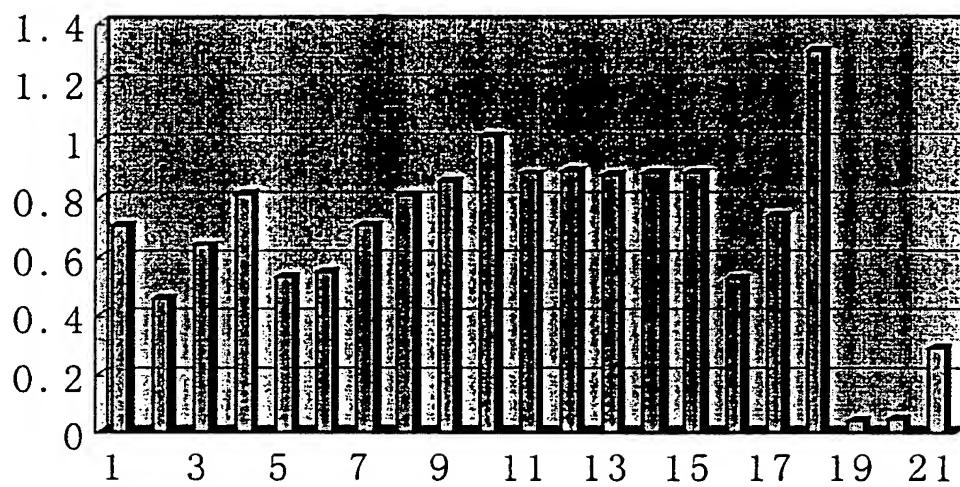


图 2

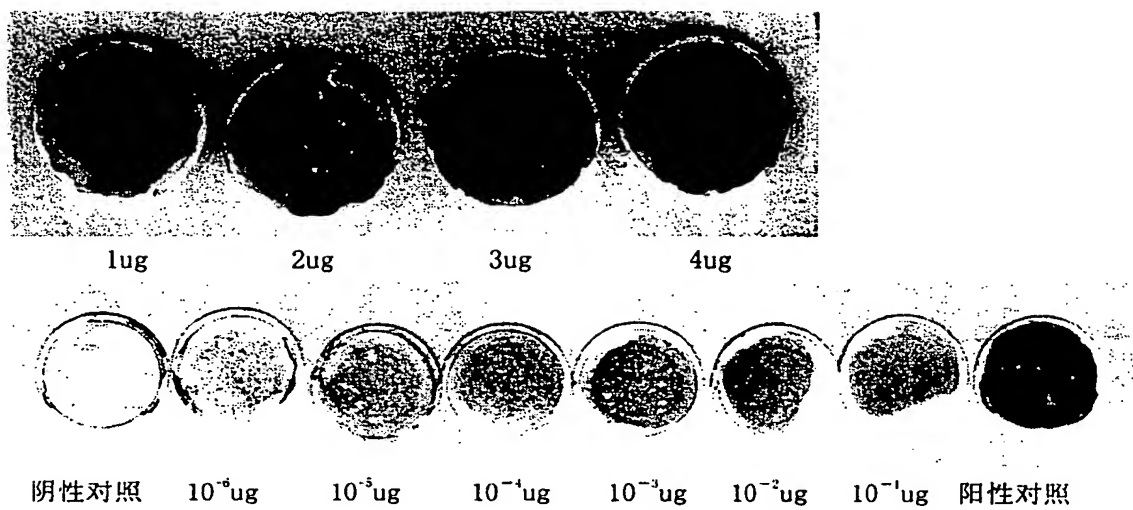


图 3

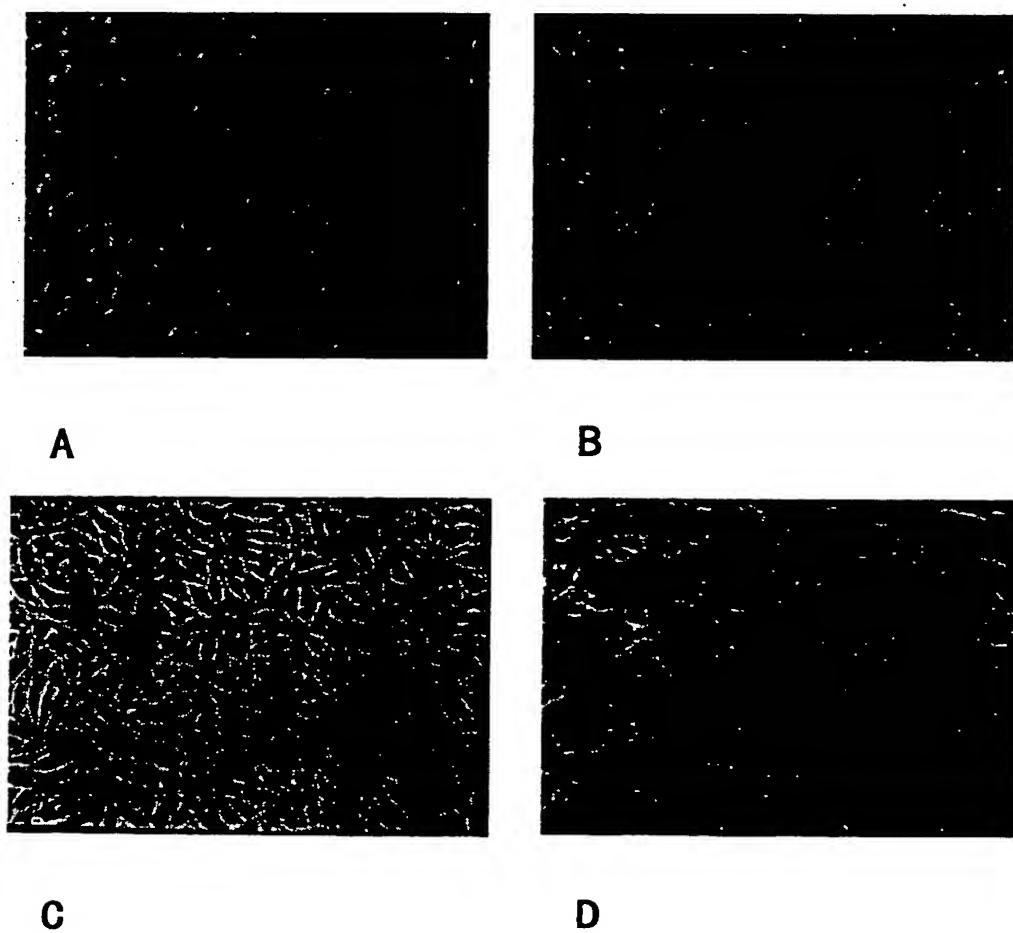


图 4

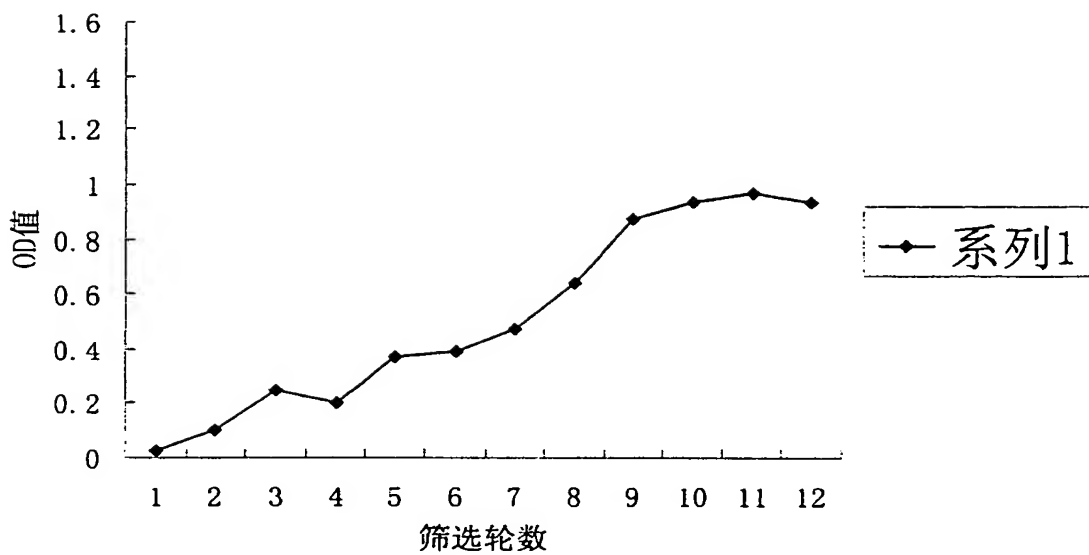
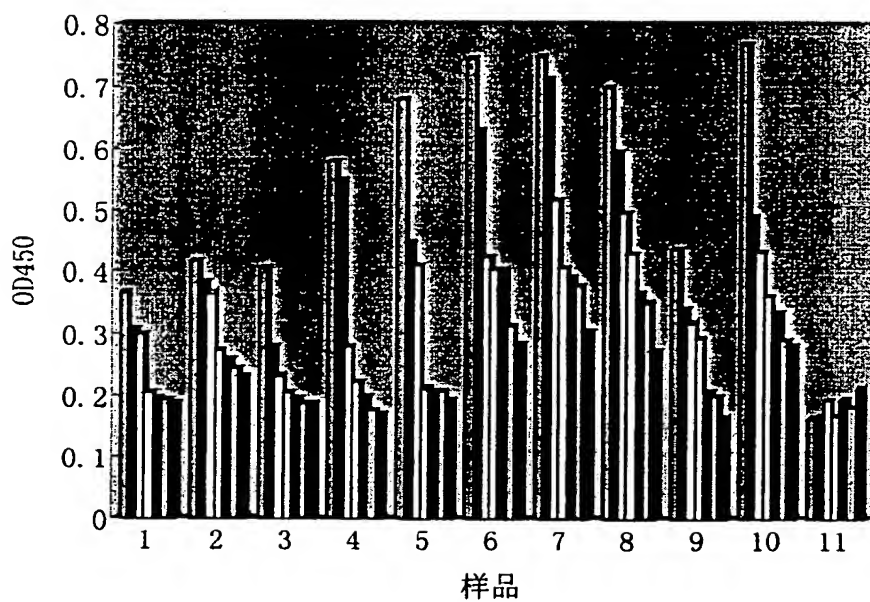


图 5



□ 1:100稀释 ■ 1:300稀释 □ 1:900稀释 □ 1:2700稀释 ■ 1:8100稀释
 □ 1:24300稀释 ■ 1:72900稀释

图 8

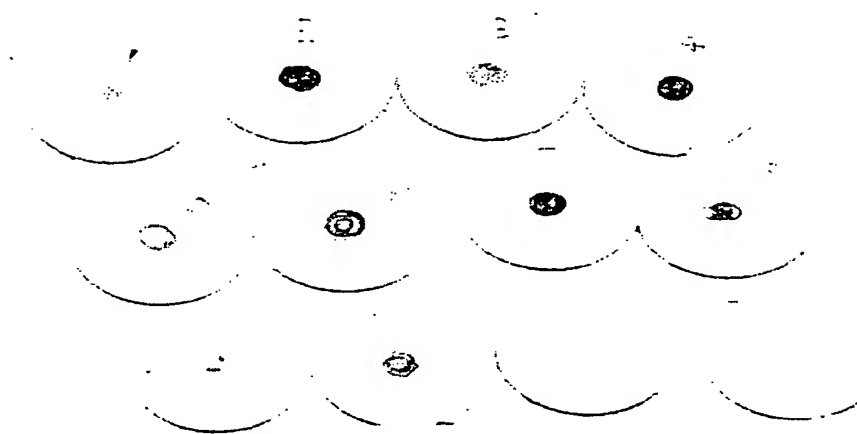


图 6

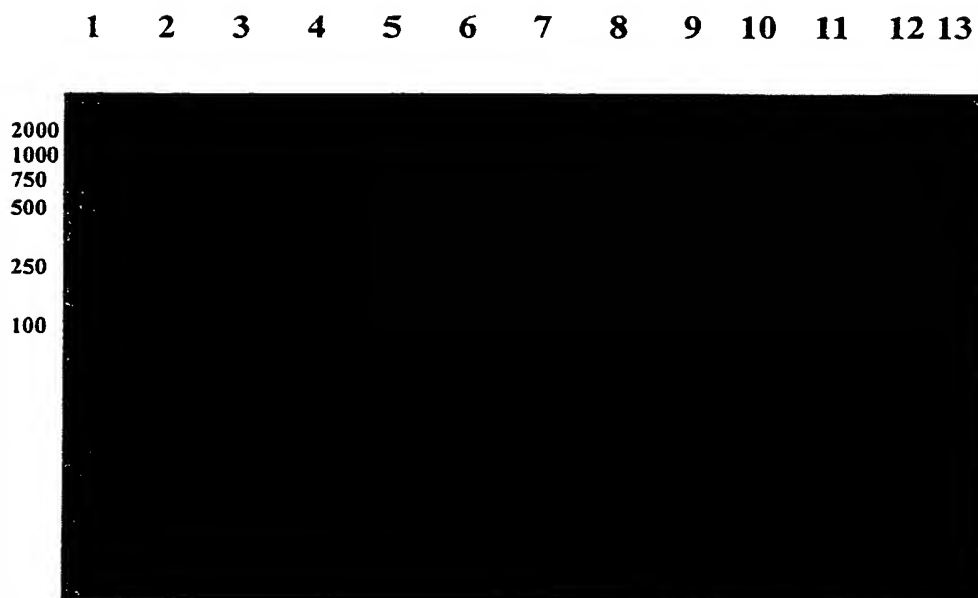


图 7

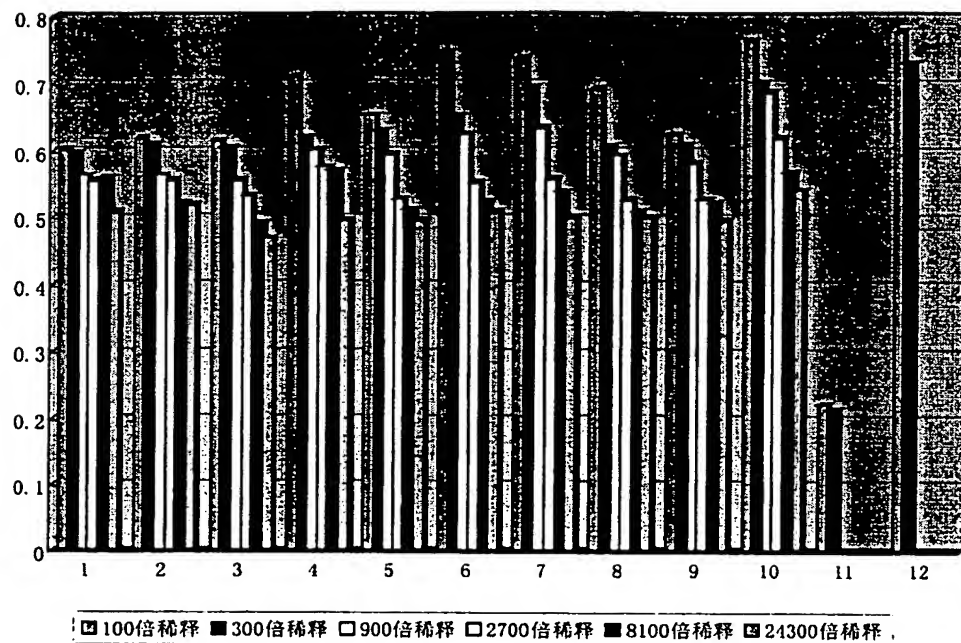


图 9

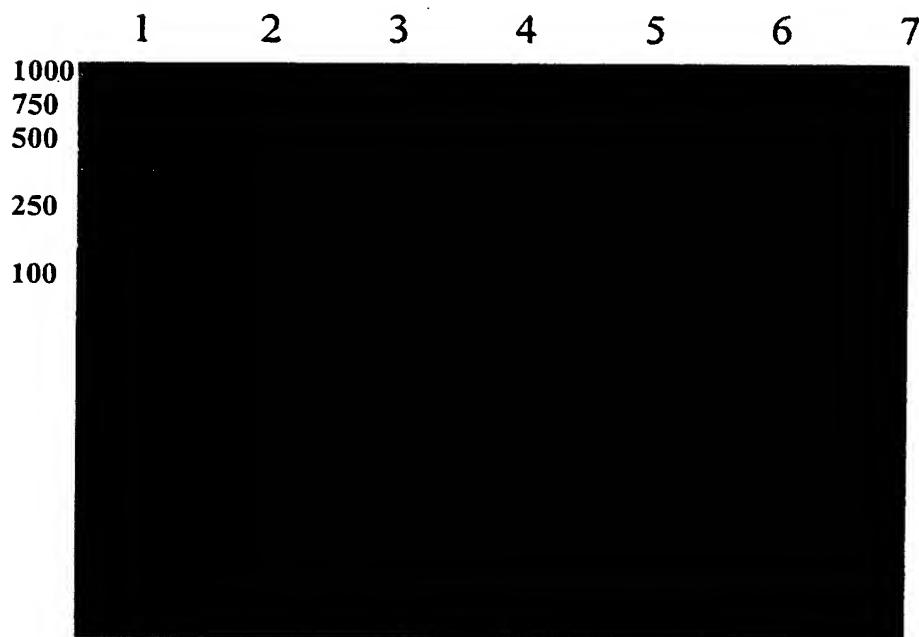


图 10